

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Daniel Santos Araújo

**ALTERAÇÕES CROMATÍNICAS EM ESPERMATOZOIDES DE PERUS
SUBMETIDOS A DOIS NÍVEIS DE PROTEÍNA BRUTA NA RAÇÃO EM
TRÊS DIFERENTES IDADES**

Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Março 2013

Daniel Santos Araújo

**ALTERAÇÕES CROMATÍNICAS EM ESPERMATOZOIDES DE PERUS
SUBMETIDOS A DOIS NÍVEIS DE PROTEÍNA BRUTA NA RAÇÃO EM
TRÊS DIFERENTES IDADES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Área de concentração: Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Março 2013.

Ao meu pai Ibraulino e à minha mãe Francina,
à minha esposa Lívia, ao meu bebê que está sendo gerado,
à minha cadela Princesa, sempre presentes
na minha vida, incentivando-me a buscar
o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial à minha esposa Lívia, pelo apoio em todos os momentos, e a minha mãe e ao meu pai, pelo incentivo e exemplo. Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, por me orientar e compartilhar esta pesquisa desde quando ainda era um projeto até a concretização final, obrigado pelos ensinamentos e paciência. Agradeço a equipe da granja, e principalmente à médica veterinária Érica Crosara Ladir, que sem o apoio não seria possível a realização e execução deste trabalho. Agradeço também aos amigos, Moline, Rosiane e Patrícia Teixeira que contribuíram para a realização desta pesquisa.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro aos projetos do Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti.

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a influência da idade e do teor proteico da ração sobre a incidência de alterações na compactação da cromatina espermática e sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de peru, bem como avaliar a influência destas alterações sobre a capacidade de fertilização dos espermatozoides e o desenvolvimento embrionário (eclosão). Foram utilizadas 120 amostras de sêmen de perus, distribuídas em 60 amostras no grupo A, aves que consumiram a ração P14 (14% de proteína bruta) e 60 no grupo B, aves que consumiram a ração P17 (17% de proteína bruta). As coletas de sêmen foram realizadas em três diferentes idades (37, 42 e 49 semanas), sendo coletadas 10 amostras de cada grupo em cada idade. As amostras foram submetidas à análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina e por microscopia eletrônica de transmissão. Na análise computacional avaliaram-se as variáveis compactação e heterogeneidade da cromatina, área e perímetro da cabeça do espermatozoide. Na microscopia eletrônica observou-se alterações da cromatina classificadas em fraca, média e forte. Foram verificadas possíveis diferenças entre os grupos que receberam os dois tipos de ração e as diferentes idades avaliadas, assim como, a correlação entre as alterações cromatínicas e a taxa de fertilidade e eclosão dos ovos obtidos dos lotes de perus avaliados. O protocolo utilizado (pré-fixação com formol salina, esfregaço do sêmen em lâmina, secagem em temperatura ambiente, desnaturação pré-coloração com ácido clorídrico 1N, coloração com azul de toluidina pH 4,0 em cubeta de vidro, desidratação em série de concentrações crescentes de álcool, diafanização com xanol e montagem com bálsamo do Canadá) foi eficiente para a observação visual, porém para a análise computacional da compactação da cromatina em espermatozoides de peru utilizando captura de imagens digitais, necessita de novas adaptações e padronizações. Os resultados demonstraram que a análise computacional de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina ainda não foi confiável para analisar de alterações cromatínicas de peru. As análises morfométricas demonstraram que as cabeças de espermatozoides de perus jovens possuem área maior em comparação com perus de meia idade e perus velhos e que o perímetro da cabeça é uma variável importante na avaliação da fertilidade de perus. Os resultados obtidos na microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que esta técnica é eficiente na avaliação de alteração da compactação da

cromatina em espermatozoides de peru, podendo ser utilizada como técnica de avaliação de fertilidade em perus. A existência de correlação negativa entre alterações cromatínicas espermática e fertilidade, e mais intensamente com eclosão, permite concluir que estas alterações prejudicam a fertilidade do peru, influenciando no processo de fertilização e na evolução embrionária, além que ração com teor de 17% de proteína bruta afeta negativamente nas taxas de fertilidade e eclosão, onde a partir de 42 semanas de idade os perus passam apresentar mais alterações na estrutura cromatínica.

Palavras-chave: Cromatina, espermatozoides, perus.

Abstract

The present study aimed to evaluate the influence of age and protein level in the diet on the incidence of changes in condensation chromatin sperm of turkey, and also to evaluate the influence of these changes on the fertilizing capacity of sperm and embryonic development (hatching). Were used a total of 60 samples of semen turkeys, divided into 30 samples in group A: males fed diet P14 (14% protein) and 30 in group B: males fed diet P17 (17% protein). The semen was collected in the same flock when males had three different ages (37, 42 and 49 weeks) and collected 10 samples from each group at each age.

All samples were divided in two aliquots which were stored at two different fixing solutions. For computer analysis of sperm chromatin condensation, one drop of semen was placed in 2 ml of formolcitrate solutions. For analysis by transmission electron microscopy, another drop of semen was placed in 2 ml of Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde; sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2). For staining was following the protocol that Rodrigues et al (2009) using staining with toluidine blue. Denaturation pre-staining with 1N hydrochloric acid for 10 minutes after completion of the semen smears on slides and dried at room temperature. The solution used for staining of toluidine blue in 0.025% pH4 in cuvettes for 20 minutes with subsequent dehydration in a series of increasing alcohol concentrations, cleared with xylene and assembly with Canada balsam oil. Digital images were captured, segmented to several heads of spermatozoa per program developed and evaluated in SCILAB:, perimeter, length, width, intensity and heterogeneity of chromatin compaction was used as the default value of the chromatin compaction bottom quartile of mean values the gray level of the heads analyzed in a single blade. Electron microscopy was used and the samples after processing were evaluated heads 100 of each sperm sample. The heads were classified by level of chromatin descompaction: normal, weak, medium and strong. The eggs were incubated and fertility rates and hatching were calculated.

The staining protocol used allowed visual observation morphological changes, but the computational analysis was not considered reliable for lack of repeatability in the production of images and electron microscopy was considered very efficient and can be used as a technique for evaluating fertility in turkeys. The chromatin alterations observed by electron microscopy detracted fertility of turkey and hatching, because act in embryonic development. Beyond that feed content with 17% crude protein negatively affects fertility rates and hatching, where from 42-week-old turkeys are present more changes in chromatin structure

.

Key words: Chromatin, fertility, protein, sperm, turkeys.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Reprodução de perus.....	16
2.2	Espermatogênese.....	16
2.3	Alterações na cromatina versus idade em machos reprodutores.....	18
2.4	Alterações na cromatina espermática.....	19
2.5	Proteína bruta na dieta.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Amostragem.....	26
3.2	Conservação das amostras.....	26
3.3	Conservação com Azul de Toluidina.....	26
3.4	Análise computacional da compactação da cromatina.....	26
3.5	Análise da compactação cromatínica por microscopia eletrônica de transmissão.....	27
3.6	Cálculo da taxa de fertilização e eclosão.....	28
3.7	Análise Estatística.....	28
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Avaliações dos esfregaços.....	30
4.2	Avaliação computacional.....	31
4.3	Avaliações de microscopia eletrônica.....	35
5	DISCUSSÃO.....	41
5.1	Coloração com Azul de Toluidina.....	41
5.2	Avaliação computacional.....	41
5.3	Avaliações de microscopia eletrônica.....	41
6.	CONCLUSÕES.....	47
7.	REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) alimentados com ração P14.....	32
Tabela 2: Média Desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo3) alimentados com ração P17.....	32
Tabela 3: Média Desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo3) sem considerar diferença na dieta alimentar	33
Tabela 4: Média Desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) considerando diferença na dieta alimentar: Ração P14 (14% de PB) e Ração P17 (17,5% de PB).....	34
Tabela 5: Correlação entre variáveis da análise computacional (área (A), perímetro (P), heterogeneidade (HC), descompactação cromatínica (DC)) e Eclosão (EC) e Fertilidade (F).....	35
Tabela 6: Mediana dos níveis de descompactação da cromatina avaliados na microscopia eletrônica das cabeças dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) na dieta alimentar com ração P14 (Média \pm desvio padrão).....	37
Tabela 7: Mediana dos níveis de descompactação da cromatina avaliados na microscopia eletrônica das cabeças dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) na dieta alimentar com ração P17.....	38
Tabela 8: Mediana dos níveis de descompactação da cromatina avaliados na microscopia eletrônica das cabeças dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) considerando diferença na dieta alimentar com ração P14 (14%) e ração P17 (17,5%).....	38
Tabela 9: Correlação entre níveis de alteração da cromatina (Fraco (FRT), Médio (MT), Forte (FT) e Total (TT)) e Eclosão (EC) e Fertilidade (F).....	39

Tabela 10: Correlação entre níveis de alteração da cromatina (FRT) Fraco, (MT) Médio e (FT) Forte e as variáveis da análise computacional: área (A), perímetro (P), heterogeneidade (HC), descompactação cromatínica (DC).....40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Eletromicrografia de espermatozoide de peru em corte longitudinal observa-se pequeno ponto de descompactação da cromatina (seta sem letra), considerado como baixo nível de descompactação da cromatina, nota-se presença do Perfuratorium (p) no interior do acrossoma (a) (Barra 2 μm)..... 35
- Figura 2:** Eletro micrografia de espermatozoide de peru em corte longitudinal onde se observa três pontos de descompactação (setas), considerado como nível médio de descompactação da cromatina (Barra 2 μm)..... 36
- Figura 3:** Eletromicrografia de espermatozoide de peru em corte longitudinal onde se observa alto nível descompactação da cromatina, aparentando cromatina heterogênea por toda a cabeça.(Barra 2 μm)..... 36
- Figura 4:** Eletromicrografia de espermatozoide de peru em corte longitudinal onde se observa compactação cromatínica normal. (Barra 2 μm)..... 37
- Figura 5:** Esfregaço de espermatozoides de perus hidrolisado em ácido clorídrico 1N por 10 minutos e corado em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH4,0 por 20 minutos e posterior desidratação em série de concentração crescente de álcool. Espermatozóides com cromatina mal compactada corando se em azul mais intenso (Seta) (Barra 2 μm)..... 31

LISTA DE ABREVIATURAS

PB. Proteína Bruta

AT. Azul de Toluidina

AA. Alaranjado de Acridina

HC. Homogeneidade da coloração da cabeça dos espermatozóides

DC. Diferença percentual do valor médio dos *pixels* que compõem a cabeça em relação ao valor médio dos pixels de cabeças padrão

P1. Protamina 1

P2. Protamina 2

HCl. Ácido Clorídrico

DNA. Ácido Desoxirribonucleico

UFU. Universidade Federal de Uberlândia

M. Molar

N. Normal

µm. unidade de micrômetro

A. Área da cabeça

P. Perímetro da cabeça

EC. Eclosão de peruzinhos

F. Fertilidade dos lotes

FRT. Nível fraco de descompactação da cromatina

MT. Nível médio de descompactação da cromatina

FT. Nível forte de descompactação da cromatina

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem ocupado um lugar de destaque entre os principais países exportadores de carne de peru: ostenta os títulos de terceiro produtor mundial e segundo maior exportador. O peru também está cada vez mais presente na mesa do brasileiro. (PRODUÇÃO, 2012).

Em 2011, as exportações totalizaram 141,2 mil toneladas, com uma redução de 10,5%, na comparação com o ano anterior. Já a receita cambial teve aumento de 4,7%, chegando a US\$ 444,6 milhões. O preço médio das exportações de carne de peru foi de US\$ 3.149 a tonelada em 2011, o que significa crescimento de 17% sobre 2010. O maior volume de embarques foi de industrializados (71.869 toneladas), enquanto o principal mercado comprador foi a União Europeia, com 74.737 toneladas.

Avicultura, atividade em franca expansão e importante na balança comercial brasileira, e a necessidade de abastecimento dos mercados consumidores de proteína de origem animal, determinam incessante busca por melhoramento genético dos plantéis, com intuito de elevar o potencial produtivo dos lotes comerciais (UBA, 2006). A garantia de volume de aves comerciais ao abate depende de matrizes de linhagem pesada ou corte, envolvendo matrizes de frango (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) e matrizes de perus (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758). As matrizes são exploradas ao máximo em recursos reprodutivos e a fertilidade dos machos é fator preponderante na produção de ovos férteis, determinando a viabilidade do negócio (UBA, 2006).

A diferença do segmento de produção de perus no Brasil em comparação aos demais países produtores, está no fato de que a criação de perus brasileira está sendo feita exclusivamente por empresas produtoras de carne de frango, como tentativa de diversificar as atividades e aumentar o portfólio de produtos destas empresas. Já nas demais partes do mundo, as empresas criadoras de perus têm no segmento a base de suas atividades, investindo de forma consistente em novos achados científicos no segmento (NUNES, 2006).

Através dos anos, com a aquisição de experiência e aumento do número de produtores de perus e ainda avanços nas áreas de nutrição e ambiência, muitos índices reprodutivos melhoraram significativamente em nosso país (NUNES, 2006). No entanto, as técnicas para diagnóstico de fertilidade em galos e perus são pouco exploradas. Muitas vezes, os parâmetros fisiológicos como peso corporal, peso testicular, dieta alimentar e idade da ave são correlacionados a virilidade. Fatores morfofisiológicos facilmente evidenciados na

microscopia de luz em preparados de motilidade, densidade, vitalidade e morfologia espermática, também são usados para a avaliação da fertilidade do macho. Este tipo de metodologia também vem sendo utilizado na rotina de avaliação da fertilidade de machos em mamíferos, contudo estudos têm demonstrado que esta avaliação não é suficiente para identificar algumas alterações espermáticas que podem levar à subfertilidade, tais como alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides. Como essa patologia não é evidenciada em exame de rotina são necessários métodos específicos de avaliação dessa anomalia (BORGES, 2006).

A alimentação na avicultura representa uma grande parcela dos custos totais de produção, principalmente por conta das altas inclusões de farelo de soja, decorrentes das altas exigências proteicas dos perus. Dentro disso, vários estudos questionam a necessidade do uso de tais níveis, avaliando a redução dos mesmos, objetivando, além da manutenção do desempenho, a redução dos custos de formulação (NUNES, 2006).

O presente estudo objetivou avaliar a influência da idade e do teor proteico da ração sobre a incidência de alterações na compactação da cromatina de espermatozoides de peru, bem como avaliar a influência destas alterações sobre a capacidade de fertilização dos espermatozoides e o desenvolvimento embrionário (eclosão).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Reprodução de perus

A avicultura brasileira caracteriza-se por sua dinamicidade, eficiência e produtividade. Entretanto, sua constante evolução não deve cessar, principalmente em se tratando de garantias de conformidades de seus processos e produtos. Os aspectos voltados ao processo reprodutivo são de grande importância, considerando que exercem influência não somente sobre a produtividade de reprodutores. Assim, é importante ressaltar a importância do macho sobre a fertilidade do lote, pois é responsável pela fertilização de 10 perus ou mais (LADIR, 2012).

O objetivo do macho matriz é fertilizar o ovócito e transferir seu potencial genético para a sua progênie. Portanto, na indústria avícola, o macho matriz é 50% responsável pela fertilização, sendo necessária atenção especial ao seu manejo de criação (MURAKAMI; GARCIA, 2005). Os espermatozoides são células altamente especializadas consistindo de várias estruturas de membrana. Suas propriedades físicas e integridade funcional determinam funções fisiológicas importantes, incluindo motilidade e capacidade fertilizante (CEROLINI et al., 1997).

Os espermatozoides são geralmente células, muito menores que os ovócitos e estão estruturados de modo a permitir o máximo de eficiência de deslocamento, o que aumenta a chance de eles chegarem ao ovócito. São células pequenas, alongadas com formato hidrodinâmico e com uma longa cauda que é utilizada na propulsão (SOBIOLOGIA, 2011).

2.2 Espermatozoides

O processo pelo qual espermatozoides são originados a partir de espermatozônias é conhecido por espermatozogênese. Ocorre no interior dos túbulos seminíferos, responsáveis pela produção de gametas, e no ducto epididimário, que colabora no processo de maturação dos espermatozoides. Esse processo corresponde a eventos seriados envolvendo modificações nucleares e citoplasmáticas, resultando em células haploides altamente móveis e adaptadas para sobreviver por longos períodos fora do corpo (GILBERT, 1982; RUSSEL et al., 1990; BANKS, 1992; RUSSEL; GRISWOLD, 1993; HAFEZ, 2000; AIRE, 2003; SOARES, 2006a).

De acordo com Gilbert (1982), o tempo de maturação dos espermatozoides no testículo das aves varia para cada espécie. Normalmente as espermatozônias se multiplicam por volta da

quinta semana após o nascimento da ave, e os espermatócitos primários aparecem próximo da sexta semana de vida. Na décima semana estas células se multiplicam de forma intensa, observa-se presença de espermatócitos secundários aumentando o volume dos túbulos. Assim, as primeiras espermátides aparecem, em um fluxo contínuo até a vigésima semana. Os testículos estarão aptos a produzir espermatozoides em volume para garantir a fertilização na cópula após esse período em galos.

Outro processo importante é a espermogênese, que ocorre em mamíferos, aves e muitos peixes. A espermogênese é caracterizada por diversas alterações morfológicas que transformam a espermátide, uma célula esférica, rica em citoplasma e com núcleo contendo cromatina fruxa em espermatozoide, célula alongada, pobre em citoplasma e com núcleo contendo cromatina super condensada. Dentre outras alterações, durante a espermogênese, as histonas são total ou parcialmente substituídas por nucleoproteínas denominadas protaminas, proteínas de caráter mais básico que as histonas e com abundância de arginina e cisteína oxidada (LEWIN et al., 1999). Essas proteínas dão origem a uma cromatina extremamente condensada e inerte, pois grupos funcionais amina dessas proteínas interagem com a fita de DNA através de seus grupos fosfato, neutralizando o esqueleto fosfodiéster (LOIR; LINNEAU, 1978; EVENSON et al., 1980; CORTENS; LOIR, 1981; BALHORN, 1982; CHIVA et al., 1987; NAKANO et al., 1989; LEWIN et al., 1999; BELETTI; MELLO, 2004), sendo esta interação denominada complexo DNA-proteína ou simplesmente cromatina. Nas aves, a protamina presente no núcleo da célula espermática é conhecida como galline (NAKANO et al., 1975 e 1989).

A condensação nuclear durante a espermogênese é alcançada pela substituição de histonas somáticas com proteínas de transição que serão posteriormente substituídas por protaminas (MEISTRICH, 1989; GREEN et al., 1994; KISTLER et al, 1996). No entanto, o núcleo de espermatozoides maduros mantém alguns domínios de cromatina que contêm histonas que são montados com o DNA com uma organização típica nucleossomal (ALLEN; BRADBURY; BALHORN, 1996; PITTOGGI et al, 1999; ZALENSKAYA; BRADBURY; ZALENSKY, 2000). Modificações epigenéticas de cromatina espermática podem contribuir para a reprogramação do genoma no início da embriogênese (NANASSY e CARRELL, 2008).

As protaminas são altamente básicas e proteínas nucleares específicas nos espermetozóides estão associadas com 85% do DNA (TANPHAICHITR et al, 1978; GATEWOOD et al., 1990). Os 15% restantes correspondem a DNA associado a Histonas ainda presentes, sendo modificações epigenéticas de cromatina no início da embriogênese as responsáveis para tal

substituição de histonas por protaminas. Em vários mamíferos, incluindo os seres humanos (GUSSE; CHEVAILLIER, 1986; McKAY; RENAUX; DIXON, 1986) e ratos (BELLVE et al., 1988), dois tipos de protaminas P1 e P2 estão presentes em núcleos de espermatozoides. Contrariamente à P1 que é sintetizada como uma proteína madura, P2 resulta de um processamento proteolítico de um precursor, tal como foi relatado em ratos e no homem (ALIMI et al., 1993). Durante a montagem do domínio de protaminas pode haver uma variedade de alterações químicas, incluindo a fosforilação e desfosforilação (MARUSHIGE; MARUSHIGE, 1975) além da formação de ligações dissulfeto (CALVIN; BEDFORD, 1971), ambos os processos sendo essencial para a alta compactação cromatínica (DADOUNE, 2003). Estudos mostram que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas podem levar à formação de distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozoides que se torna frouxa, podendo afetar a fertilidade (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980; BELETTI; MELLO, 2006).

Alguns espermatozoides com anormalidades de cromatina são capazes de fertilizar oócitos *in vivo* e *in vitro*, mas os danos do DNA podem persistir durante todo o período embrionário e induzir a apoptose e fragmentação do embrião, que pode levar a aborto (ELLINGTON et al. 1998; TWIGG; IRVINE; AITKEN, 1998). No entanto, quando os danos não são muito extensos no complexo DNA-proteína, esse pode ser reparado pelo ovócito (TWIGG; IRVINE; AITKEN, 1998).

2.3 Alterações cromatínicas versus idade de machos reprodutores

Rodrigues e outros (2009) encontraram coeficientes de correlação negativos, apesar de não serem significativos estatisticamente, entre alterações na cromatina e tamanho da cabeça do espermatozoide. Também observaram que a área (μm^2) e o perímetro (μm) eram estatisticamente maiores em galos jovens em relação a galos velhos. Essa diferença pode ser justificada pela presença de um maior número de alterações morfológicas, independentes das alterações de cromatina nos espermatozoides dos galos jovens, o que também foi observado por Soares e Beletti (2006a) em preparados corados com alaranjado de acridina.

Rodrigues e outros (2009), também destacam que a descompactação e a heterogeneidade têm coeficientes de correlação negativos em relação às variáveis área, perímetro, largura e comprimento da cabeça de espermatozoide.

Segundo Rodrigues e outros (2009) existe um maior número de alterações na cromatina (descompactação e heterogeneidade) nos animais velhos, ou seja, estes animais apresentavam espermatozoides com cromatina menos homogênea dentro de uma mesma cabeça e com

menor compactação em relação a cabeças normais. Soares e Beletti (2006a) também observaram que galos velhos (60 semanas) apresentam maior número de alterações na compactação cromatínica do que galos jovens.

Rocha Júnior e Baião (2001) avaliaram sêmen de galos jovens (35 semanas) e velhos (68 semanas) e não encontraram diferença significativa nas características físicas espermáticas (motilidade, vigor e turbilhonamento), mostrando que a queda de fertilidade em galos velhos seria causada por outros fatores. Sendo assim fica demonstrado nos trabalhos de Rodrigues e outros (2009) que um dos fatores que poderia estar influenciando a fertilidade de galos mais idosos seria as alterações na compactação da cromatina espermática.

Vários estudos (BELETTI; COSTA; VIANA, 2004; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005a, BELETTI; COSTA; VIANA 2005b) concordam que a avaliação computacional pode encontrar alterações que não seriam percebidas pelas análises tradicionais. Rodrigues e outros (2009) ainda destacam que a avaliação computacional de esfregaços de sêmen de galo corados com azul de toluidina permitiu uma avaliação menos subjetiva e mais sensível da compactação da cromatina dos espermatozoides.

Rodrigues e outros (2009) concluíram em estudos que não existe correlação significativa entre tamanho da cabeça de espermatozoides de galo e condensação de cromatina, no entanto, a cabeça dos espermatozoides de galos velhos tende a ser maior. Ainda que Galos velhos apresentem espermatozoides com mais alterações na cromatina, tanto na homogeneidade como na intensidade de compactação.

Trabalhando com touros zebus Beletti; Costa e Viana (2005b) verificaram que as cabeças de espermatozoides de zebu altamente fértil tendem a ser menores.

Beletti; Costa e Guardieiro (2005a) verificaram que fatores como: espessura do esfregaço, configurações de microscópio e câmera poderiam influenciar na produção da imagem, causando grande variação para valores de tons de cinza dentre as cabeças de uma mesma lâmina, provocando variações irreais para a descompactação da cromatina na cabeça de espermatozoides de touros. Na tentativa de diminuir este efeito, Beletti; Costa e Guardieiro (2005a) utilizaram como valor padrão o quartil inferior dos valores de descompactação em uma mesma lâmina. Assim, este valor seria utilizado como referência de cromatina normal, diminuindo a ampla variabilidade de uma mesma lâmina.

2.4 Alterações na cromatina espermática

Ainda em 1966, Gledhill verificou que alguns touros com distúrbios de fertilidade apresentavam parte de seus espermatozoides com maior intensidade na resposta à reação de

Feulgen. Inicialmente considerava-se a maior intensidade de coloração Feulgen positiva como um maior conteúdo de DNA presente nessas células. Mais tarde houve substituição desta teoria, pelo uso de microespectrofotometria em ultravioleta verificando que não havia conteúdo de DNA diferente para essas células. A diferença encontrada na reação de Feulgen foi atribuída a uma alteração na cinética hidrolítica do DNA, devido alteração no complexo DNA-proteína, tornando o DNA mais sensível à hidrólise e a cromatina mais frouxa.

Sendo assim, Mello (1982) com base nos estudos de Gledhill (1966) desenvolveu um método, denominado metacromasia induzida, que permite identificar algumas alterações na cromatina em espermatozoides de touro. A ligação de moléculas do corante azul de toluidina (pH 4,0) ocorre nos grupos fosfato ionizados do DNA. O pH 4,0 garante que outros sítios (ânions) de ligação do corante não estejam ionizados. Assim, os espermatozoides normais se corariam em verde, mas aqueles com anomalias no complexo DNA-proteína se corariam em violeta. Na cromatina normal de espermatozoides, a maioria dos grupos fosfato está bloqueada por protaminas e, consequentemente, poucas moléculas do corante se ligariam ao DNA, resultando em uma coloração de verde a azul claro. Entretanto em espermatozoides com cromatina pouco compactada, haveria mais ligações com as moléculas do corante, resultando numa coloração de azul escuro a magenta, devido a ressonância de elétrons entre as moléculas de corantes vizinhas (fenômeno da metacromasia). Mas, somente um alto grau de alteração cromatínica seria identificado por esse método. Esse processo pode ter sua sensibilidade aumentada pela hidrólise ácida antes da coloração, ou seja, de acordo com o seguinte protocolo: tratamento com ácido clorídrico (HCl 4 N a 25°C, 15 a 20min) seguido de coloração com azul de toluidina (pH 4,0) (Rodrigues et al 2009). Espermatozoides normais, que são caracterizados por cromatina altamente compactada, seriam pouco afetados pela hidrólise e, consequentemente, corar-se-iam em azul claro. Cromatina espermática com baixo grau de alterações poderia ter as protaminas parcialmente extraídas, promovendo ligações das moléculas do corante com os grupos fosfato do DNA. Assim, a sensibilidade do método para identificar anormalidades na cromatina espermática é aumentada. Este método também foi utilizado por Rodrigues e outros (2009) trabalhando com análise de compactação da cromatina de espermatozoides de galo.

O citômetro de fluxo vem sendo usado para avaliar concentração total, morfologia espermática, integridade de membrana, atividade mitocondrial e integridade acrossômica com o uso de sondas fluorescentes específicas, que se ligam aos diferentes compartimentos do espermatozoide (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980; ELLINGTON et al., 1998; JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001, 2003;

CHRISTENSEN et al., 2005). Na avaliação da estrutura da cromatina espermática (sperm chromatin structure assay - SCSA), o corante usado é o laranja de acridina, para determinar a suscetibilidade do DNA à desnaturação ácida. De acordo com Love (2005), por meio dos gráficos gerados os resultados são interpretados como a população principal, formada por espermatozoides com cromatina íntegra, que fluorescem em verde, e graficamente sua distribuição tem forma elíptica; e a porcentagem de COMPat, representa as células fora da população principal, que fluorescem em vermelho e aparecem à direita da população principal. Recentemente, passou a ser chamada de índice de fragmentação do DNA (células vermelhas + [vermelhas/ vermelhas + verdes]).

Fatores metacromáticos, como os proporcionados pelo alaranjado de acridina (AA) e o azul de toluidina (AT), podem ser utilizados na avaliação da integridade cromatínica do espermatozoide humano e de outras espécies animais, pois os parâmetros clássicos de qualidade espermática não estão bem correlacionados aos quadros de infertilidade e subfertilidade (EVENSON; LARSON; JOST, 2002).

Em galos, alterações morfológicas nos espermatozoides dividem-se em defeitos de cabeça e de peça intermediária. Mas práticas de rotina não têm sido eficientes na identificação de alterações espermáticas que podem levar à subfertilidade, como alterações na cromatina dos espermatozoides (SOARES; BELETTI, 2006a).

Devido à queda da fertilidade do lote observada com o passar do tempo, a reposição de parte dos machos é um recurso utilizado para melhorar a fertilização. A avaliação da fertilidade dos machos é importante, assim como a busca por métodos mais precisos e rápidos na execução. Técnicas para diagnóstico de fertilidade em aves são pouco exploradas. Métodos clássicos utilizados para exames andrológicos em outras espécies e diretamente relacionados com o espermatozoide, como motilidade, concentração, vigor e morfologia espermática, também são usados para a avaliação da fertilidade de galos e perus (RODRIGUES et al., 2009).

É sabido que a detecção de anomalias na cromatina dos espermatozoides em aves tem sido negligenciada. Sendo assim, Soares e Beletti (2006a) compararam as alterações morfológicas e de compactação de cromatina com a fertilidade de dois lotes de galos. Observaram que, no lote com os galos mais férteis, foi encontrado maior número de espermatozoides com alterações morfológicas, enquanto no lote com menor fertilidade foi encontrado um maior número de alterações na compactação da cromatina, mostrando a importância desta característica na fertilidade dos galos.

A maioria das técnicas usadas para avaliação do sêmen é realizada pela análise visual do examinador, a qual possui certo grau de subjetividade. Na tentativa de se diminuir a

subjetividade, as falhas do examinador e aumentar a repetibilidade entre examinadores, foi proposto o uso de análise de imagem por computador para a avaliação da motilidade e da morfologia dos espermatozoides (BELETTI; COSTA; VIANA, 2005b). Esses mesmos autores destacam outra aplicação para análise de imagem, a caracterização da cromatina de espermatozoides corada com azul de toluidina, concomitantemente usada com a análise morfométrica.

O grupo de pesquisa "Cybernetic Vision" do Instituto de Física de São Carlos da USP, em colaboração com Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, criou programas em ambiente "Scilab", para análise morfológica de espermatozoides, independente da espécie (BELETTI e COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005b, c). Esses programas avaliam detalhadamente a morfologia da cabeça e estabilidade da cromatina, utilizando esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina. Demonstrou-se que esses programas identificam alterações morfológicas e de cromatina em sêmen de mamíferos, não percebidas pela análise visual do espermograma de rotina (BELETTI e COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2004BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005a, BELETTI; COSTA; VIANA, 2005b).

Soares e Beletti (2006a) realizaram estudos preliminares com sêmen de galo corados com AT e análise visual em microscópio de luz e, apesar de não conseguirem desenvolver um protocolo de avaliação confiável, verificaram alta correlação entre cromatina frouxa e baixa fertilidade.

Soares e Beletti (2006a) e Rodenas, Murgas e Maciel (2005) também descreveram que a fixação dos espermatozoides em lâminas faz com que sua cabeça helicoidal sofra algumas fraturas, alterando o acesso das moléculas de corante, fazendo com que todos os espermatozoides sejam corados como se possuíssem alterações cromatínicas, por isso foi utilizado formol citrato.

Soares e Beletti (2006a) concluíram que a coloração com AT foi pouco eficiente na avaliação da compactação da cromatina, pois, esfregaços de sêmen fresco de galo com posterior fixação geram artefatos que levam a alterações na forma da cabeça e na integridade da cromatina, não sendo indicados em métodos de avaliação de fertilidade.

Porém, Soares e Beletti (2006a) verificaram que o protocolo utilizando fixação com formol citrato, realização de esfregaço e posterior desnaturação ácida foi mais eficiente e permitiu a diferenciação visual dos espermatozoides mais bem corados (cromatina alterada), por isso, foi aplicado para a análise computacional das cabeças. Mas para Rodenas, Murgas e Maciel (2005) os espermatozoides de galo apresentam cromatina mais frouxa que a de outras espécies, dispensando a desnaturação ácida.

Segundo trabalhos recentes em mamíferos, alterações de cromatina espermática poderiam não alterar a capacidade de o espermatozoide fecundar o ovócito, mas interfeririam na evolução do embrião, impedindo a formação de blastocisto ou mesmo levando a morte embrionária em fase pós-implantação (SOARES e BELETTI, 2006a). A avaliação em aves relatando como as alterações na cromatina espermática interferem na fertilização e/ou desenvolvimento embrionário seria mais fácil do que em mamífero, pois seria simples determinar a taxa de fertilização em ovoscópio com nove dias de incubação e a taxa de eclosão ao final da incubação.

Soares e Beletti (2006b) fizeram uma avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozoides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) através de microscopia eletrônica de transmissão e identificaram que no núcleo a cromatina é geralmente densa e levemente granular. Contudo, também foram observados espermatozoides com cromatina com vários níveis de compactação. Soley (1993 e 1996) identificou graus de compactação variados em uma mesma célula, devido à presença de pequenas regiões mais claras, indicativas de condensação incompleta do núcleo. Soares e Beletti (2006b) relataram também que geralmente as células com deficiência de compactação apresentavam todo o núcleo mais claro e, portanto, mal compactado.

De acordo com Soares e Beletti (2006b), sêmen de galos férteis possuem uma pequena quantidade de espermatozoides com baixa compactação de cromatina e alterações morfológicas e que alterações na compactação da cromatina frequentemente não são acompanhadas por alterações morfológicas, porém as alterações morfológicas geralmente são acompanhadas por alterações na compactação da cromatina.

Estudos realizados por Beletti, Costa e Guardieiro (2005a) demonstraram que defeitos morfológicos nos espermatozoides de touro podem ter implicações graves nas propriedades hidrodinâmicas destas células, incluindo efeito sobre a sua progressão uniforme e movimentos retilíneos normais.

Segundo Beletti, Costa e Guardieiro. (2005a), as alterações morfológicas causadas por alterações na estrutura da cromatina deveriam aumentar o tamanho da cabeça do espermatozoide.

2.5 Proteína bruta na dieta

As proteínas apresentam as mais diversificadas funções no organismo. A falta de proteína prejudica a produtividade das aves, porém, o excesso reduz a eficiência devido ao incremento calórico. Dietas com 16% de proteína bruta (PB) são utilizadas na alimentação de fêmeas, e

esta mesma ração é fornecida aos galos. Isso representa um custo 7 a 11% maior do que uma dieta específica com 12% de proteína para reprodutores de corte (TARDIN, 1990).

A criação comercial de perus muito se assemelha a de frangos de corte, é uma produção intensiva e integrada a grandes empresas. O maior custo de produção é a variável alimentação, que representa cerca de dois terços do custo de produção da ave. Sendo que a variável reprodução, pode consideravelmente tornar a atividade inviável economicamente, caso haja porcentagem elevada de subfertilidade no plantel de machos (LUCCA et al, 2009).

Segundo Bertechini (1998), a elevação do nível de PB da dieta eleva os níveis de aminoácidos e, desse modo, supera as necessidades dos aminoácidos limitantes. Entretanto, dietas com níveis proteicos elevados sobrecarregam os processos de digestão, absorção e eliminação do nitrogênio não aproveitável, afetando diretamente o fígado e os rins. Esses efeitos reduzem a eficiência dessas rações, além de elevar o custo.

De acordo com Lucca e outros (2009) em reprodutores de frango de corte, o nível de 12% de proteína bruta (PB) é suficiente para manter um bom desempenho reprodutivo.

Ladir e outros (2012) confirmaram melhores resultados de correlação entre anormalidades morfológicas e alterações na cromatina em dietas com maior nível de proteína, que pode ser explicado pelo alto requerimento de proteínas no processo de compactação, também citado por Beletti, Costa e Viana (2004) que relatou que a substituição de histonas por protaminas que ocorre durante a espermiogênese é responsável pela alta compactação da cromatina de espermatozoides.

Em galos Borges e outros (2006) recomendaram rações com percentual de PB de 13% para machos reprodutores na fase de 21 a 61 semanas de idade. Rodenas (2005), preconizou níveis de PB próximo aos 12,6%.

Ladir e outros (2012) confirmaram em estudo que a fertilidade e eclosão foram menores com o avanço das idades dos galos. Estes resultados confirmam a hipótese de que galos mais velhos possuem maiores alterações intrínsecas ao espermatozoide, fertilidade diminuída com consequente diminuição da eclosão. Ladir e outros (2012) ainda conclui que os galos alimentados com maior nível de proteína (15%) apresentam melhores resultados em relação à compactação e a densidade da cromatina das cabeças dos espermatozoides. Este mesmo grupo apresenta valores de tamanho de espermatozoides menores, o que indica menores alterações morfológicas.

De acordo com Sotirov; Dimitrov e Jeliazkov. (2002) proteínas são fatores limitantes na dieta de aves e influencia tanto parâmetros quantitativos quanto qualitativos do sêmen desses animais.

Meyer e outros (1980) utilizaram nos seus estudos com perus, dietas com teor de proteínas em 12% e 17% e encontraram melhores resultados, porém não significativos, para a dieta com teor maior de proteína para as variáveis: volume do ejaculado e concentração de espermatozoides.

Para Sexton (1986) uma dieta com cerca de 12,8% de proteína promove queda na qualidade do sêmen. O uso de 17% de proteína na dieta até a idade de 28 semanas e posteriormente 8% de proteína resulta em uma produção de espermatozoides satisfatória até o final do período de reprodução (idade de 47-52 semanas). A qualidade do sêmen é ainda influenciada por outros fatores relacionados diretamente ou não ao nível da qualidade da alimentação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram utilizadas 60 amostras de sêmen de perus, divididas em 30 amostras no grupo A, aves que consumiram a ração P14 (14% de proteína) e 30 no grupo B, aves que consumiram a ração P17 (17% de proteína). As coletas de sêmen foram realizadas nos mesmos lotes quando as aves tinham três diferentes idades (37, 42 e 49 semanas), sendo coletadas 10 amostras de cada grupo em cada idade.

3.2 Conservação das amostras

Todas as amostras foram divididas em duas alíquotas que foram conservadas em dois diferentes fixadores. Para análise computacional da compactação da cromatina espermática, uma gota de sêmen foi colocada em 2ml de formolcitrato de acordo com Soares e Beletti (2006a). Para análise em microscopia eletrônica de transmissão, outra gota de sêmen foi colocada por 24 horas em 2ml de solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; paraformoldeído 2%; tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2)(BOZZOLA e RUSSELL, 1998).

3.3 Coloração com Azul de Toluidina

Seguiu protocolo de Rodrigues e outros (2009) utilizando coloração com Azul de Toluidina. Desnaturação pré-coloração com ácido clorídrico 1N por 10 minutos, após realização de esfregaços do sêmen em lâminas e secagem em temperatura ambiente. Para coloração usou a solução de azul de toluidina 0,025% em pH4, em cubetas por 20 minutos com posterior desidratação em série de concentrações, diafanização com xanol e montagem com bálsamo do Canadá.

3.4 Análise computacional da compactação cromatínica.

Para a análise computacional, 50 imagens digitais foram capturadas de cada lâmina utilizando-se microscópio óptico Leica DM500, acoplado a câmera Leica ICC50, com objetiva de 100x (imersão). Deslocando-se a lâmina em ziguezague, foram capturadas 50 imagens de forma aleatória em toda a extensão da lâmina, sempre mantendo a mesma regulagem de iluminação durante as capturas de uma mesma lâmina. Utilizando programa desenvolvido em ambiente de programação matemática Scilab®, as cabeças dos espermatozoides contidas nas 50 imagens foram segmentadas automaticamente. Segmentação

é o termo utilizado em análise de imagem computacional para designar o processo de isolamento em uma nova imagem das regiões de interesse (ROI), no caso cada cabeça de espermatozoide. Ou seja, as cabeças dos espermatozoides que não possuírem sobreposição de imagem foram cortadas e coladas em fundo branco.

Essas cabeças de espermatozoide foram analisadas em outro programa desenvolvido em SCILAB, que avalia: área, perímetro, comprimento, largura (BELETTI; COSTA; VIANA, 2005b), intensidade e heterogeneidade da compactação cromatínica (RODRIGUES E OUTROS, 2009, KANAYAMA; BELETTI, 2011). Como em Beletti,Costa e Guardieiro, (2005a), foi utilizado como valor padrão de compactação de cromatina o Quartil inferior das médias dos valores de nível de cinza das cabeças analisadas em uma mesma lâmina. Subsequentemente, para cada amostra, a diferença entre o valor padrão e o valor médio de cada cabeça analisada foi determinada. Esta diferença foi transformada em uma porcentagem do valor padrão e denominada de Descompactação da Cromatina (DC). A Heterogenicidade da Cromatina (HC) foi dada pelo coeficiente de variação dos valores dos níveis de cinza em cada cabeça.

3.5 Análise da compactação cromatínica por microscopia eletrônica de transmissão

As amostras fixadas em Karnovsky foram processadas, sendo utilizado quatro amostras de cada grupo em três diferentes idades, totalizando oito amostras por idade, para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão. Estas amostras foram centrifugadas (100 x g) por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes para eliminar o máximo de resíduo de glutaraldeído. O pellet da última centrifugação foi ressuspensionado em 300 μ L de agar 4% liquefeito a 55 °C. Após o resfriamento em temperatura ambiente o agar tornou-se sólido e foi retirado do tubo e recortado em fragmentos de aproximadamente 1 mm³. Esses fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% por 30 minutos e em de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% por mais de 30 minutos. Estes fragmentos foram desidratados em séries crescentes de acetona a 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% e 100% ficando 5 minutos nos cinco primeiros banhos e 10 minutos nos três últimos. Posteriormente, o material foi colocado em solução de resina Epon e acetona na proporção 1:1 por 12 horas. Após esse período, a solução contendo o material foi colocada na estufa a 37°C por 12 a 24 horas. Posteriormente os blocos foram incluídos em resina pura e mantidos durante 2 dias em estufa a 60°C. Finalmente, os blocos foram submetidos a cortes ultrafinos em ultra-micrótomo, os quais foram colocados em telas de cobre de 200 mesh e contrastados

com acetato de uranila e nitrato de chumbo (BOZZOLA; RUSSELL, 1998). Todas as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, quando foram avaliadas 100 cabeças de espermatozoides de cada amostra. As cabeças que possuíssem os núcleos homogeneamente escuros (eletrodensos) foram consideradas possuidoras de cromatina com compactação normal. As cabeças que possuíssem o núcleo claro (eletrolúcidos) ou de coloração heterogênea foram consideradas possuidoras de cromatina com alterações e foram classificadas de acordo com níveis de descompactação da cromatina: fraco, o qual apresenta na estrutura cromatínica um pequeno ponto de descompactação; médio, onde a cromatina apresenta entre um e três pontos de descompactação; forte, presença acima de três pontos de descompactação ou apresentação bastante heterogênea em mais de um ponto da cabeça do espermatozoide. Foram determinados quatro diferentes níveis de alterações cromatínicas na avaliação das cabeças de espermatozoides por microscopia eletrônica.

3.6 Cálculo da taxa de fertilização e eclosão

Para avaliação de fertilidade os ovos coletados provenientes de cada tratamento foram encaminhados para um incubatório, localizado na cidade de Uberlândia, estado de Minas Gerais.

Os ovos foram incubados em máquinas de incubação PETERSIME modelo VB504, de estágio múltiplo e submetido às mesmas condições do manejo de incubação padronizado por empresas produtoras de peruzinhos de um dia.

A fertilidade foi avaliada pelo método de ovoscopia com amostragem de 450 ovos por tratamento semanalmente, no nono dia de incubação. A taxa de eclosão foi a porcentagem de peruzinhos nascidos dentre ovos que iniciaram a incubação em cada semana.

3.7 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado teste Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados possuíam distribuição normal. Uma vez confirmada a normalidade dos dados da análise computacional, foi utilizado o teste t para comparação entre médias, com significância para $P \leq 0,05$. Os dados da microscopia eletrônica não apresentaram distribuição normal, sendo utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon para comparação entre grupos, também com significância para $P \leq 0,05$. Assim foram verificadas possíveis diferenças entre os grupos tratados com rações contendo diferentes níveis de proteína e diferenças entre os grupos com diferentes idades. Também foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson entre as

variáveis referentes ao tamanho da cabeça (área, perímetro, largura e comprimento) e à compactação de cromatina (descompactação e heterogeneidade), bem como entre a avaliação da cromatina por microscopia eletrônica, análise de imagem computacional, taxas de fertilização e eclosão e as alterações de cromatina identificadas por análise computacional (intensidade e heterogeneidade de compactação).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliações dos esfregaços

Após avaliação visual dos esfregaços realizados pelas variações metodológicas testadas, optou-se pela realização de esfregaços do sêmen em lâminas, secagem em temperatura ambiente, desnaturação pré-coloração com ácido clorídrico 1N, coloração em cubeta de vidro por 20 minutos, desidratação em série de concentrações crescentes de álcool, diafanização com xilol e montagem com bálsamo do Canadá. Com este protocolo de desnaturação e coloração adotado, foi possível diferenciar visualmente os espermatozoides mais bem corados, considerados portadores de alterações da cromatina. O mesmo protocolo foi aplicado a todas as amostras de sêmen de perus, com 37 (jovens), 42 (meia idade) e 49 (velhos) semanas de idade (Figura 6)



Figura 5: Esfregaço de espermatozoides de perus hidrolisado em ácido clorídrico 1N por 10 minutos e corado em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH4,0 por 20 minutos e posterior desidratação em série de concentração crescente de álcool. Espermatozoides com cromatina mal compactada corando-se em azul mais intenso (Seta) (Barra 100 μ m).

4.2 Avaliação computacional

As tabelas 1, 2, 3 e 4 contêm os resultados obtidos na avaliação computacional. Na tabela 1 que contém os dados referentes aos animais que consumiram a ração P14, pode-se verificar que houve diferença significativa entre as áreas da cabeça dos espermatozoides, sendo maior em perus do Grupo 1 quando comparado com os perus do Grupo 2. Já o perímetro da cabeça foi maior nos animais do Grupo 1, seguido pelos perus Grupo 3 e menor nos animais do Grupo 2. A HC foi significativamente maior em perus Grupo 1 quando comparados aos demais e a DC comportou-se semelhante ao perímetro da cabeça, sendo significativamente maior nos perus Grupo 1, seguido pelos perus Grupo 3 e menor nos animais do Grupo 2.

Tabela 1: Média e desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) alimentados com ração P14 (Média \pm desvio padrão)

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Área (μm^2)	543,3 ^a \pm 61,6	319,8 ^b \pm 162,6	359,2 ^b \pm 99,9
Perímetro (μm)	19,2 ^a \pm 0,9	16,9 ^b \pm 2,5	17,9 ^c \pm 2,2
HC	30 ^a \pm 6,4	6,4 ^b \pm 4,9	7,2 ^b \pm 4,2
DC	28,3 ^a \pm 9,6	15,7 ^b \pm 9,9	19,1 ^c \pm 11,7

Letras distintas na mesma linha significam diferença estatística ($P<0,05$)

HC: Heterogeneidade

DC: Descompactação da cromatina

Para perus alimentados em dietas contendo ração P17 (tabela 2), não houve diferença significativa entre as áreas das cabeças no Grupo 1 e Grupo 2, mas estes diferiram dos espermatozoides de perus Grupo 3, apresentando estes últimos áreas da cabeça menor. Não houve diferença significativa para perímetro da cabeça entre as três diferentes idades no grupo que se alimentou de ração P17. A HC foi significativamente maior em perus Grupo 1 e a DC significativamente maior em perus Grupo 1, seguido dos Grupo 3 e do Grupo 3, que apresentaram menor DC.

Tabela 2: Média e desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozóides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) alimentados com ração P17 (Média \pm desvio padrão)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Área (μm^2)	468,9 ^a \pm 61,9	495,3 ^a \pm 185,5	414,1 ^b \pm 105,9
Perímetro (μm)	19,6 ^a \pm 1,6	20,3 ^a \pm 2,7	19,4 ^a \pm 1,4
HC	28,9 ^a \pm 7,6	6,4 ^b \pm 3,4	8,5 ^b \pm 7,9
DC	39,7 ^a \pm 18,3	7,5 ^c \pm 2,9	22 ^b \pm 11,8

Letras distintas na mesma linha significam diferença estatística ($P<0,05$)

HC: Heterogeneidade

DC: Descompactação da cromatina

Quando se avaliou as amostras separando somente em idades, não levando em consideração as diferentes dietas alimentares (tabela 3), houve diferença significativa para a variável área da cabeça espermática dos perus Grupo 1, que foi significativamente maior do que nas outras

idades. Não houve diferença significativa para o perímetro da cabeça entre as idades. O HC foi significativamente maior para perus Grupo 1 quando comparado aos demais, e o DC foi significativamente maior em perus Grupo 1, seguido dos perus Grupo 3 e pelo Grupo 2, que apresentaram menor DC.

Tabela 3: Média e desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozoides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) sem considerar diferença na dieta alimentar (Média \pm desvio padrão)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Área (μm^2)	506,1 ^a \pm 71,1	397,8 ^b \pm 190,3	385 ^b \pm 103,5
Perímetro (μm)	19,4 ^a \pm 1,3	18,3 ^a \pm 3,1	18,6 ^a \pm 1,9
HC	29,4 ^a \pm 6,9	6,4 ^b \pm 4,2	7,8 ^b \pm 6,1
DC	34 ^a \pm 15,3	12,1 ^c \pm 8,5	20,5 ^b \pm 11,5

Letras distintas na mesma linha significam diferença estatística ($P<0,05$)

HC:Heterogeneidade

DC: Descompactação da cromatina

Quando consideramos as diferentes dietas alimentares para com as características avaliadas na análise computacional (tabela 4) foi verificado que perus jovens possuíam área da cabeça estatisticamente maior em dieta contendo ração P14, porém perus Grupo 2 possuíam área da cabeça menor estatisticamente em dietas P14, além de apresentarem também perímetro da cabeça estatisticamente menor em dietas com P14 e descompactação da cromatina (DC) menor significativamente em dietas com P17. Em perus Grupo 3 não houve diferença significativa para nenhuma das características avaliadas por computação.

Tabela 4: Média e desvio padrão das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozoides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) considerando diferença na dieta alimentar: Ração P14 (14% de PB) e Ração P17 (17,5% de PB) (Média \pm desvio padrão)

	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
	P14	P17	P14	P17	P14	P17
Área (μm^2)	543,3 ^a \pm 61,6	468,9 ^b \pm 61,9	319,8 ^a \pm 162,6	495,3 ^b \pm 185,5	359,2 ^a \pm 99,9	414,1 ^a \pm 105,9
Perímetro (μm)	19,2 ^a \pm 0,9	19,6 ^a \pm 1,6	16,9 ^a \pm 2,5	20,3 ^a \pm 2,7	17,9 ^a \pm 2,2	19,4 ^a \pm 1,4
HC	30 ^a \pm 6,4	28,9 ^a \pm 7,6	6,4 ^a \pm 4,9	6,4 ^a \pm 3,4	7,2 ^a \pm 4,2	8,5 ^a \pm 7,9
DC	28,3 ^a \pm 9,6	39,7 ^a \pm 18,3	15,7 ^a \pm 9,9	7,5 ^b \pm 2,9	19,1 ^a \pm 11,7	22 ^a \pm 11,8

Letras distintas na mesma linha para uma mesma idade significam diferença estatística entre as rações testadas ($P<0,05$)

HC: Heterogeneidade

DC: Descompactação da cromatina

O coeficiente de correlação entre as variáveis eclosão e fertilidade com a média de área das cabeças de espermatozoides somando-se as duas dietas com ração P14 e P17 permaneceu baixa em 0,02 e 0,03 respectivamente. Contudo para perímetro o coeficiente de correlação foi negativo de -0,37 e -0,46, frente eclosão e fertilidade respectivamente. O coeficiente de correlação foi considerado alto 0,60 e 0,45 para com heterogeneidade (HC) frente eclosão e fertilidade respectivamente. A variável descompactação de cromatina apresentou coeficiente de correlação de 0,55 para eclosão e 0,26 para fertilidade, sendo considerado alto quando correlacionado com eclosão e baixo para com fertilidade (Tabela 5).

Tabela 5: Correlação entre variáveis da análise computacional.

	EC	F
EC	1,00	
F	0,92	1,00
A	0,02	0,03
P	-0,37	-0,46*
HC	0,60*	0,45*
DC	0,55*	0,26

* significam diferença estatística ($P < 0,05$)

**Área (A), Perímetro (P), Heterogeneidade (HC), Descompactação cromatínica (DC), Eclosão (EC) e Fertilidade (F)

4.3 Avaliações de microscopia eletrônica

As figuras 1, 2 e 3 representam os diferentes níveis de alteração na compactação da cromatina nas cabeças de espermatozoides de Peru, classificados em: fraco (Figura 1), médio (Figura 2), forte (Figura 3) e compactação normal (Figura 4).

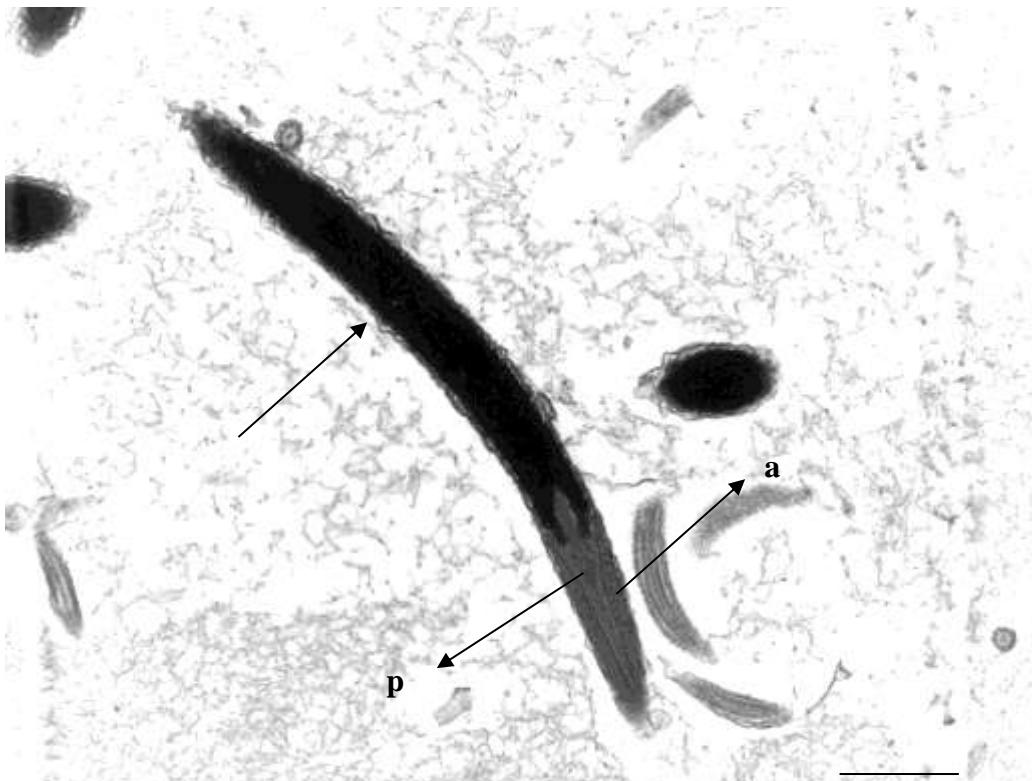


Figura 1: Eletromicrografia de espermatozoide de Peru em corte longitudinal observa-se pequeno ponto de alteração da cromatina (seta sem letra), considerado como baixo nível de alteração da cromatina, nota-se presença do Perfuratorium (p) no interior do acrosoma (a) (Barra 2 μm).

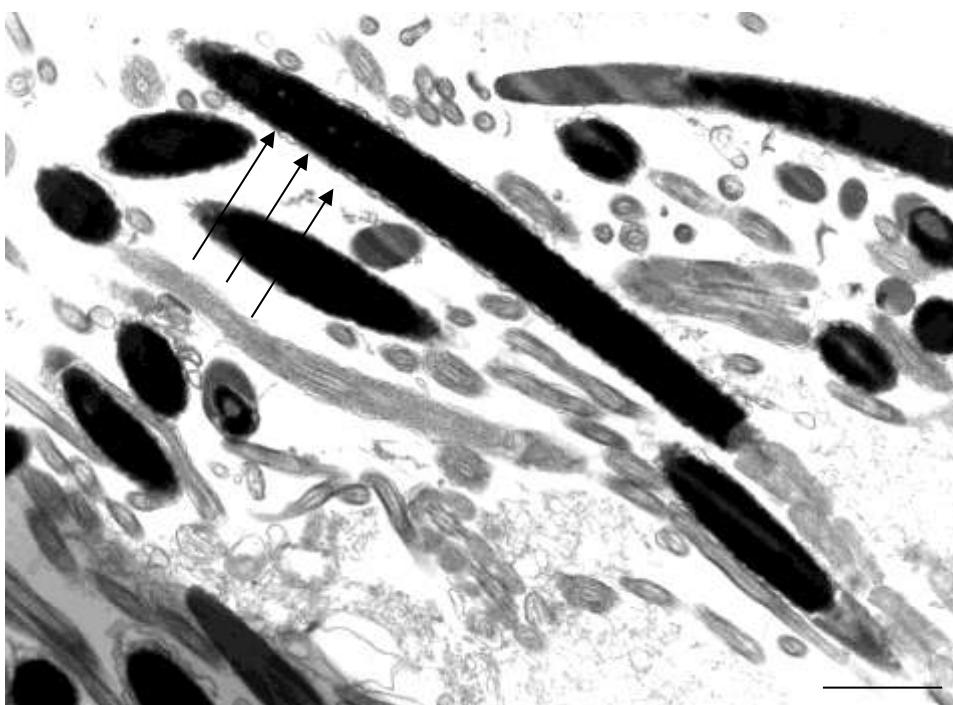


Figura 2: Eletro micrografia de espermatozoide de peru em corte longitudinal onde se observa três pontos de alterações (setas), considerado como nível médio de alteração da cromatina (Barra 2 μ m).

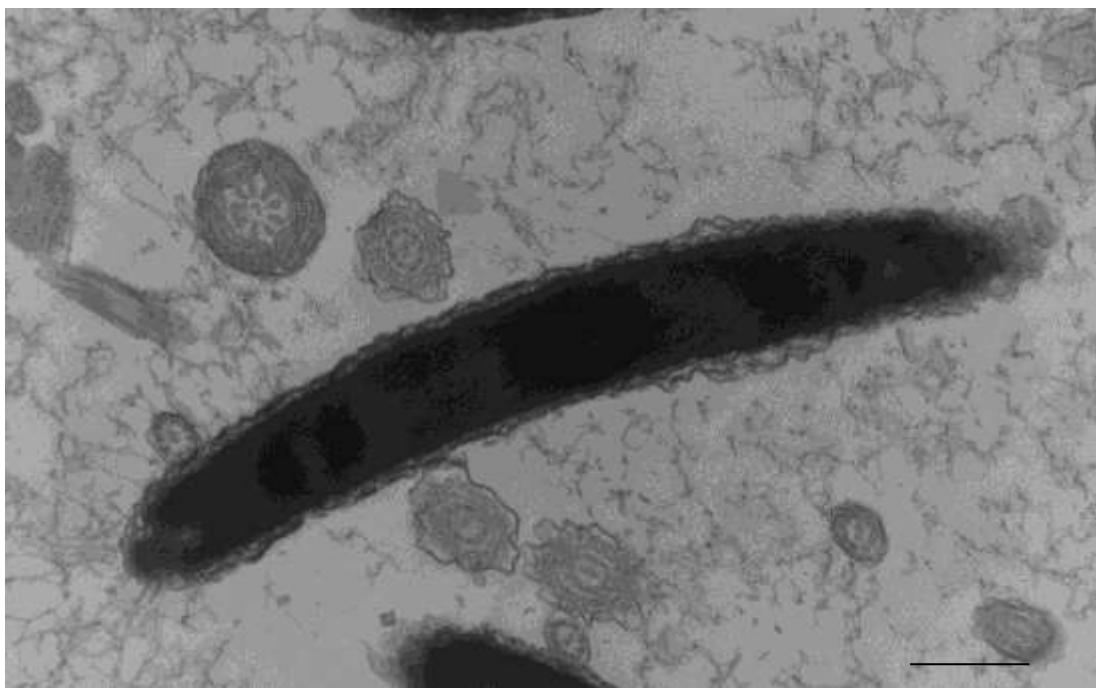


Figura 3: Eletromicrografia de espermatozoide de peru em corte longitudinal onde se observa alto nível de alteração da cromatina, aparentando cromatina heterogênea por toda a cabeça. (Barra 1 μ m).

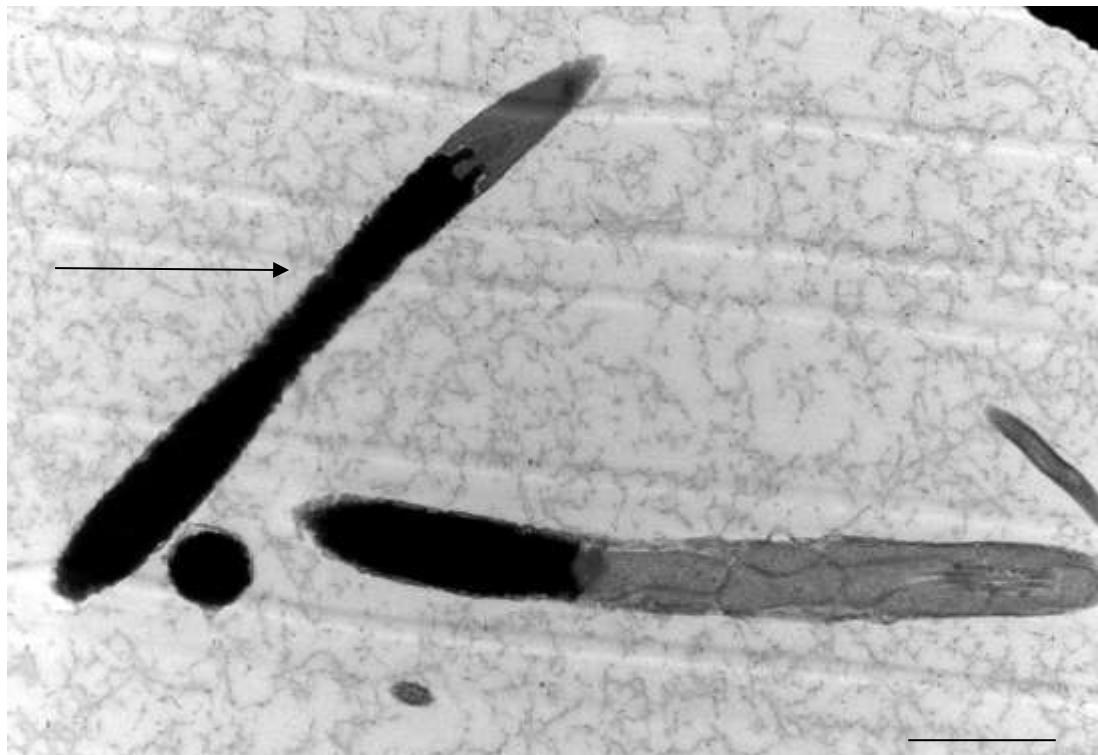


Figura 4: Eletromicrografia de espermatozoide de peru em corte longitudinal onde se observa compactação cromatínica normal. (Barra 2 μm).

As tabelas 6, 7 e 8 contêm os resultados obtidos nas análises por microscopia eletrônica de transmissão. Não houve diferença estatística entre as idades para os níveis de alteração da cromatina, conforme seguem as tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Mediana dos níveis de alteração da cromatina avaliados na microscopia eletrônica das cabeças dos espermatozoides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) na dieta alimentar com ração P14

Alteração Cromatínica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Fraco	8,9	3,4	4,4
Médio	2,0	3,9	7,1
Alto	1,0	6,0	2,5
Total	1,5	10,6	14,7

Letras distintas na mesma linha significam diferença estatística ($P<0,05$)

Tabela 7: Mediana dos níveis de alteração da cromatina avaliados na microscopia eletrônica das cabeças dos espermatozoides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) na dieta alimentar com ração P17

Alteração Cromatínica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Fraco	8,3	8,2	15,8
Médio	7,4	17,6	11,5
Alto	6,2	15,0	16,5
Total	2,6	18,4	24,7

Letras distintas na mesma linha significam diferença estatística ($P<0,05$)

Quando foi considerado a variável dieta alimentar diferente, observou-se que em perus Grupo 2 que o consumo de ração P17 provocou significativamente alterações na cromatina das cabeças dos espermatozoides, em níveis: fraco, médio e total. Em perus Grupo 3 foi observado o mesmo comportamento abordado para perus Grupo 2, havendo maior número de alterações da cromatina estatisticamente significativas nos níveis: fraco, médio, forte e total; ou seja, em todos os níveis quando consumiram ração P17, não ocorrendo diferença significativa em perus Grupo 1 (tabela 8).

Tabela 8: Mediana dos níveis de alteração da cromatina avaliados na microscopia eletrônica das cabeças dos espermatozoides de perus com 37 semanas (Grupo 1), 42 semanas (Grupo 2) e 49 semanas (Grupo 3) considerando diferença na dieta alimentar com ração P14 (14%) e ração P17 (17,5%)

Alteração Cromatínica	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
	P14	P17	P14	P17	P14	P17
Fraco	11,6 ^a	10,2 ^a	9,4 ^a	26,5 ^b	11,4 ^a	26,9 ^b
Médio	0,5 ^a	1,7 ^a	0 ^a	4,5 ^b	0 ^a	3,9 ^b
Alto	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,1 ^b
Total	12,1 ^a	13,6 ^a	9,9 ^a	33,3 ^b	11,4 ^a	33,4 ^b

Letras distintas na mesma linha para uma mesma idade significam diferença estatística entre as rações testadas ($P<0,05$)

Para a microscopia eletrônica foi observado quatro variáveis: alterações cromatínicas fraca, média, forte e total, essa última somatória das anteriores.

Os níveis de alterações apresentaram correlações negativas a variável eclosão (Tabela 9), para a variável fertilidade, somente não houve correlação negativa no nível mais forte de alteração da cromatina, mas mesmo assim, houve correlação negativa quando se confrontou nível de alterações fraco, médio e somatória de todos os níveis de alterações da cromatina.

Tabela 9: Correlação entre níveis de alterações de cromatina (Fraco (FRT), Médio (MT), Forte (FT) e Total (TT)) e Eclosão (EC) e Fertilidade (F)

	EC	F	FRT	MT	FT	TT
EC	1,00					
F	0,92*	1,00				
FRT	-0,27	-0,10	1,00			
MT	-0,24	-0,15	0,95*	1,00		
FT	-0,05	0,05	0,92*	0,97*	1,00	
TT	-0,25	-0,10	0,99*	0,98*	0,95*	1,00

* significam diferença estatística ($P < 0,05$)

Houve diferença significativa quando se correlaciona as variáveis da análise computacional área e perímetro e nível fraco de alteração da cromatina por microscopia eletrônica, área e perímetro e nível médio, sendo que o HC também obteve correlação significativa, observando o nível forte de alteração da cromatina, houve correlação significativa deste com HC e área da cabeça (tabela 10).

Tabela 10: Correlação entre níveis de alterações da cromatina (FRT) Fraco, (MT) Médio e (FT) Forte e as variáveis da análise computacional: área (A), perímetro (P), heterogeneidade (HC), descompactação cromatínica (DC)

	FRT	MT	FT	TT
FRT	1*			
MT	0,95*	1*		
FT	0,92*	0,97*	1*	
TT	0,99*	0,98*	0,95*	1*
A	0,71*	0,71*	0,63*	0,72*
P	0,48*	0,5*	0,31	0,48*
HC	0,29	0,44*	0,49*	0,36
DC	-0,09	0,15	0,20	0,00

*significa diferença estatística ($p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

5.1 Coloração com AT

O protocolo escolhido neste trabalho foi o mesmo utilizado por Rodrigues e outros (2009) para sêmen de galo, o que aparentemente permitiu leitura visual das lâminas. Este protocolo também foi utilizado por Ladir e outros (2012) também para sêmen de galo. Fato que demonstra semelhança na composição e formação da estrutura da cromatina entre cabeças de espermatozoides de galos e perus. Nos esfregaços corados foi possível verificar alterações morfológicas de cabeças (Figura 6), sendo que algumas cabeças apresentaram-se altamente coradas e às vezes com cabeças enroladas.

No protocolo de fixação foi utilizado formol citrato antes da realização do esfregaço, o que havia apresentado bons resultados em estudos de Rodrigues e outros (2009). De acordo com Soares e Beletti (2006a) a fixação posterior à realização do esfregaço de espermatozoides de galo faz com que a cabeça helicoidal sofra algumas fraturas, alterando o acesso das moléculas de corante, fazendo com que todos os espermatozoides sejam corados como se possuíssem alterações cromatínicas, como também foi sugerido por Rodenas, Murgas e Maciel (2005).

Portanto, a forma de fixação pode contribuir para que um protocolo não seja confiável para a avaliação visual da compactação de cromatina utilizando AT, como ocorreu em estudos de Soares e Beletti (2006a). A principal diferença entre os protocolos utilizados por estes autores e o escolhido para a avaliação computacional neste trabalho é a hidrólise com ácido clorídrico, promovida antes do início da coloração, que não foi realizada no trabalho citado. A hidrólise promove a liberação de grupos de aldeídos do DNA liberando sítios de ligação para os corantes. Estes autores afirmaram que os espermatozoides de galo possuem cromatina mais frouxa que a de outras espécies, dispensando a desnaturação ácida, sendo assim, pode ser que a cromatina em espermatozoides de perus pode ser mais compacta comparada a de galo, pois sem a desnaturação ácida observou-se a tonalidade de coloração fraca e pouco perceptível visualmente.

5.2 Avaliação computacional

Como em Beletti, Costa e Guardieiro (2005a) optou-se pela utilização do quartil inferior como referência padrão de cromatina normal, a fim de se amenizar possíveis distorções

na leitura computacional provocadas por diferenças na espessura do esfregaço, maior ou menor retirada do corante durante os processos de desidratação e diafanização, diferenças nas configurações de microscópio e câmera, além de outras variações não identificadas. No entanto, comparando-se os resultados obtidos na avaliação computacional com os obtidos com microscopia eletrônica ou com os existentes na literatura, percebe-se que a avaliação computacional não foi confiável. Portanto, provavelmente a formação das imagens em tons de cinza em software SCILAB, permitiu variações entre as capturas de uma mesma amostra, prejudicando a correta caracterização do DC e do HC, ou seja, o protocolo utilizado não foi confiável, mesmo utilizando o quartil inferior como referência de compactação cromatínica normal. Contudo, a segmentação automática ocorreu da forma esperada e em muito contribuiu para avaliação de um grande número de cabeças de espermatozoides. Também é importante salientar que as variações de cor não interferem nas avaliações morfométricas e portanto, sendo as variações ocorridas no presente trabalho apenas de cor da cabeça, acredita-se que os dados morfométrico sejam confiáveis.

Na análise morfométrica computacional, realizada a partir da avaliação de cerca de 69.000 cabeças de espermatozoides, os resultados obtidos para a área (μm^2), onde com o aumento da idade houve diminuição do tamanho da cabeça dos espermatozoides, foi semelhante ao obtido por Rodrigues e outros (2009) quando avaliaram espermatozoides de galo em diferentes idades. Os perus Grupo q alimentados com ração P14 obtiveram a maior média para área da cabeça, o que de acordo com a literatura seria pela presença de um maior número de alterações morfológicas, o que pode estar relacionado com alterações da cromatina. Porém o fator idade não se manifestou da mesma forma em perus Grupo 1 alimentados com ração P17, pois nestes a área da cabeça foi maior nos perus Grupo 2. Levando em consideração que os animais que receberam esta ração apresentaram menores taxas de fertilidade e eclosão, é esperado que existissem diferenças entre os espermatozoides deste grupo com o que recebeu ração P14. Quando foram consideradas todas as medias para área da cabeça independente do tipo de ração consumida, os perus jovens continuaram com maior média quando comparados a outras idades. No caso da somatória das médias dos perímetros das cabeças não houve diferença entre as idades, somente para perus alimentados com a ração P14, onde os perus Grupo 1 continuaram mantendo diferença significativa em relação a perus de outras idades. Os resultados encontrados pela análise computacional a partir de imagens

geradas por lâminas coradas com AT foram opostos aos resultados de Beletti, Costa e Viana (2005b), onde se concluiu que as alterações morfológicas causadas por alterações na estrutura da cromatina deveriam aumentar o tamanho do espermatozoide. O tamanho do espermatozoide representado pela área da cabeça e pelo perímetro não manifestaram a tendência de aumento com a idade, sugerindo que as alterações cromatínicas não aumentariam as alterações morfológicas. Sendo assim avaliamos o DC e o HC, e verificamos que a Descompactação da Cromatina (DC) foi maior nos perus Grupo 1, independente do tipo de ração consumida, o DC também foi alto em perus Grupo 3, porém nesta idade a média para área da cabeça foi a menor entre as três idades, novamente contrariando Beletti, Costa e Viana (2005b). Como já discutido, quando gerados por análise computacional, os dados sobre cromatina no presente trabalho não são confiáveis, portanto, não seria prudente discutir ou correlacionar estes dados com os de morfometria. Independente disso, quando as coletas mais tardias apresentaram menores áreas e perímetros em relação aos perus jovens, houve semelhança nos resultados de Ladir (2012), que avaliou área e perímetro da cabeça de espermatozoides e observou que galos mais jovens possuíam cabeças maiores que os de meia idade e mais velhos.

Na avaliação das dietas com diferentes níveis de proteína bruta observamos que as variáveis de área e perímetro foram menores em perus Grupo 1 comparadas aos de perus do Grupo 2 e os do Grupo 3, semelhante ao encontrado por Ladir e outros (2012) trabalhando com galos em diferentes dietas de PB, e contrário ao verificado por Soares e Beletti (2006a) e Rodrigues e outros (2009), onde a ocorrência de maior área em cabeças de espermatozoides foi em galos jovens, justificado como sendo pela ocorrência de maior número de alterações morfológicas. Mas, Soares e Beletti (2006a) e Rodrigues e outros (2009) não trabalharam com dietas diferentes para proteína bruta e levaram em consideração somente a idade das aves.

Rodrigues e outros (2009) encontraram coeficientes de correlação negativos, apesar de não serem significativos estatisticamente, entre alterações cromatínicas e área da cabeça. Se abordarmos por nossa análise computacional o fator idade pode nos induzir a concluir que em espermatozoides de perus Grupo 1 há mais alterações cromatínicas do que em perus Grupo 3, contrapondo a literatura científica. Essa contraposição seria anulada com o resultado da análise computacional de variáveis como HC e DC, porém os valores de DC não mantiveram uma linha de tendência entre aumento de alterações

cromatínicas e aumento de alterações morfológicas com tamanho da cabeça de espermatozóides em perus com 37 semanas para 49 semanas, semelhante em Beletti, Costa e Guardieiro (2005a), mesmo trabalhando o quartil inferior como valor padrão. Além disso, houve correlação positiva entre HC e Eclosão também entre DC e Eclosão. Estes resultados foram significativos e também incompatíveis com o que é consolidado na literatura pois, para haver eclosão, necessita-se do correto desenvolvimento embrionário e seria temeroso concluir que aumentando de descompactação e heterogeneidade cromatínica aumentaria a taxa de eclosão. Os coeficientes de correlação entre as alterações cromatínicas (DC e HC) e eclosão, e entre as alterações cromatínicas e fertilidade foram positivos e altos, demonstrando total discordância com Johnson e outros (2011) e Carrel (2012), pois isso significaria que sêmen com estas alterações seriam mais férteis e interfeririam de forma benéfica na evolução do embrião. Esses dados demonstram mais uma vez que o protocolo de análise computacional da cromatina utilizado no presente trabalho não é confiável.

Os coeficientes de correlação entre a área e eclosão e entre a área e a fertilidade mostram que esta variável morfométrica não é boa para predição de problemas de fertilidade do peru macho. Já o perímetro possui alta correlação negativa com fertilidade e eclosão, demonstrando ser uma boa variável de predição. De fato, o aumento da área da cabeça pode não ser acompanhado necessariamente de alteração de forma, não interferindo intensamente na hidrodinâmica e consequentemente, não interferindo na motilidade. Já o perímetro aumentado, sem ser acompanhado pelo aumento da área, necessariamente significa alteração de forma, o que interfere na hidrodinâmica e na motilidade e consequentemente no processo de fertilização (Beletti e Costa, 2003, Beletti et al, 2005a).

5.3 Avaliações de microscopia eletrônica

Não foram observadas diferenças significativas quanto aos níveis de descompactação identificados por microscopia eletrônica de transmissão nas diferentes idades dos perus. Mas, quando comparamos as dietas alimentares foi observado um efeito cumulativo para o uso de altas taxas de proteína bruta, onde a partir dos dados de 42 semanas de idade, os perus começaram a apresentar maior nível de alteração da cromatina fraca, média e total. Em perus com 49 semanas todos os tipos de alterações cromatínicas foram maiores em animais que consumiram a ração de maior concentração proteica. Ou

seja, o uso exacerbado da proteína bruta pode ter um efeito prejudicial direto e cumulativo na estrutura da cromatina espermática.

Correlacionando os níveis de alterações cromatínicas identificados por microscopia eletrônica de transmissão com fertilidade, observamos correlação negativa baixa, ou seja, alterações na cromatina espermática interferem no processo de fertilização em perus, porém de forma pouco intensa. De acordo com Beletti e Soares (2006b), em sêmen de galos férteis existe uma pequena quantidade de espermatozoides com baixa compactação de cromatina e alterações morfológicas e que alterações na compactação da cromatina frequentemente não são acompanhadas por alterações morfológicas, porém as alterações morfológicas geralmente são acompanhadas por alterações na compactação da cromatina. Beletti e Costa (2003) e Beletti, Costa e Guardieiro (2005a) comentam que defeitos morfológicos em espermatozoides podem ter implicações graves nas propriedades hidrodinâmicas destas células, incluindo efeitos negativos sobre movimentos retilíneos normais e progressões desuniformes, diminuindo as taxas de fertilidade.

Considerando as alterações morfológicas de área e perímetro da cabeça, estas obtidas da análise computacional, e as análises de cromatina por meio da microscopia eletrônica (ME), a correlação foi positiva e significativa, ou seja, o nível de alteração na cromatina observado em ME mesmo que fraco pode determinar alterações morfológicas, contrariando Beletti e Soares (2006b), e determinar diminuição e oscilações nas taxas de fertilidade, como sugere Beletti, Costa e Guardieiro (2005a).

Ainda sobre as consequências negativas à fertilidade, de acordo com Evenson e outros, (1980) e Beletti e Mello (2006) retratam que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas podem levar à formação de distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozoides que se tornaria frouxa. Sabe-se que no homem a existência de histonas é normal em espermatozoides, porém pode haver a permanência maior que a proporção máxima 15% de histonas na estrutura da cromatina (TANPHAICHITR et al, 1978; GATEWOOD et al., 1990), o que também levaria a uma cromatina mais frouxa, interferindo na fertilidade do macho.

Para a taxa de eclosão, variável que realmente impactará no resultado produtivo e econômico, visto que diminui a eficiência do plantel e aumenta o custo do produto final produzido na avicultura, também observamos a correlação negativa entre alterações cromatínicas representadas em níveis de alterações da cromatina e taxa de eclosão,

semelhante às avaliações de correlação para com fertilidade e alterações cromatínicas, porém mais exacerbada. A correlação foi maior para a variável eclosão do que para a variável fertilidade, demonstrando que as alterações cromatínicas possuem ação negativa sobre o desenvolvimento embrionário, ou seja, ações deletérias sobre DNA provavelmente determinando a inviabilidade do embrião prosseguir seu desenvolvimento. Soares e Beletti (2006a) comentam que de acordo com trabalhos recentes em mamíferos, as alterações de cromatina poderiam não alterar a capacidade de o espermatozoide fecundar o ovócito, ou seja, a taxa de fertilidade poderia alterar ou não, mas interfeririam na evolução do embrião, impedindo a formação de blastocisto ou mesmo levando a morte em fases pré-eclosão, havendo assim um impacto direto na taxa de eclosão.

Outros estudos em mamíferos que concluem na mesma direção dos nossos achados são Ellington e outros (1998) e Twigg; Irvine e Aitken (1998), que concluíram que alguns espermatozoides com anormalidades de cromatina são capazes de fertilizar ovócitos *in vivo* e *in vitro*, porém os danos do DNA podem permanecer durante todo o período embrionário para induzir a apoptose e posterior fragmentação do embrião, o que pode levar ao aborto. Twigg; Irvine e Aitken (1998) comentam que sob circunstâncias normais de dano no complexo DNA-proteína, esse poderia ser reparado pelo ovócito, não ocorrendo. Estudos mais recentes (Johnson et al., 2011; Carrel, 2012) mostram que alterações cromatínicas espermáticas não são necessariamente marcadas por danos no DNA, mas podem ser em histonas encontradas em pequenas regiões não protaminadas e que seriam importantes carreadoras de informações epigenéticas, necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial. Assim, esta também poderia ser outra explicação para a correlação negativa entre alterações cromatínicas e eclosão.

6. CONCLUSÕES

O uso de ração com teor de 17% de proteína bruta influencia negativamente na fertilidade do lote a partir de 42 semanas de idade.

A idade influencia negativamente a fertilidade de machos, demonstrando a necessidade de avaliação constante dos machos a partir de 49 semanas de idade.

As alterações cromatínicas observadas por microscopia eletrônica prejudicaram a fertilidade do peru e eclosão dos ovos, por atuar no desenvolvimento embrionário.

O perímetro da cabeça de espermatozoide de peru é uma variável importante na avaliação da fertilidade de perus.

A microscopia eletrônica na avaliação de alteração da compactação da cromatina em espermatozoides de peru é eficiente, podendo ser utilizada como técnica de avaliação de fertilidade em perus.

As cabeças de espermatozoides de perus jovens possuem área maior em comparação com perus de meia idade e perus velhos.

A análise computacional de esfregaços de sêmen de peru corados com azul de toluidina ainda não é confiável na avaliação de alterações cromatínicas.

O protocolo utilizado foi eficiente para a observação visual, porém para a análise computacional da compactação da cromatina em espermatozoides de peru utilizando captura de imagens digitais, necessita de novas adaptações e padronizações.

REFERÊNCIAS

- AIRE, T. A. Ultrastructural study of spermiogenesis in the turkey, *Meleagris gallopavo*. *Poultry Science*, v. 44, n. 5, p. 674-682, 2003.
- ALIMI E, MARTINAGE A, ARKHIS A, BELAICHE D, SAUTIERE P, CHEVAILLIER P.. Amino acid sequence of the human intermediate basic protein 2 (HPI2) from sperm nuclei. Structural relationship with protamina P2. *Eur J Biochem* 214:445–450, 1993.
- ALLEN MJ, BRADBURY EM, BALHORN R.. The chromatin structure of well-spread demembranated human sperm nuclei revealed by atomic force microscopy. *Scanning Microsc* 10:989–994, 1996.
- BALHORN R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *Journey of Cell Biology*; 93:298–305, 1982.
- BALHORN, R. A model for the struture of chromatin in mammalian sperm. *Journal of Cell Biology*, v. 93, p. 298-305, 1982.
- BANKS, W. J. *Histologia veterinária aplicada*. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BELETTI, M. E. MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*, v. 62, n. 3, 2004.
- BELETTI, M. E., MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA- protein complexes in bull spermatozoa. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, n. 1, p. 73-90, 1996.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v.22, p.85-90, 2005a.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *Anim. Reprod. Sci.*, v.85, p.105-116, 2005b
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotech. Histochem.*, v.79, p.17-23, 2004.

- BELLVE A.R., McKAY D.J., RENAUD B.S., DIXON G.H.. Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry* 27:2890–2897, 1988.
- BERTECHINI, A.G. *Nutrição de monogástricos*. Lavras: UFLA/ FAEPE, 1998. 193p.
- BORGES, C.A.Q. et al. Exigência de proteína e composição da carcaça de galos reprodutores de 27 a 61 semanas de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.35, n.5, p. 1971 – 1977, 2006.
- CALVIN HI, BEDFORD JM.. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 13 (Suppl): 65–75, 1971.
- CARREL D.T.. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril*, v.97, p.267-274, 2012.
- CEROLINI, S. et al. Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol Reprod* v.57, p.976-980, 1997.
- CHIVA, M.; KASINSKY, H. F.; SUBIRANA, J. A. Characterization of protamines from four avian species. *FEBS Letters*, v. 215, n. 2, p. 237-240, 1987.
- CHRISTENSEN P, BOELLING D, PEDERSEN KM, KORSGAARD IR, JENSEN J. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. *J Androl*, v.26, p.98-106, 2005.
- COURTENS, J. L.; LOIR, M. A citochemical study of nuclear changes in boar, bull, goat, mouse, rat and stallion spermatides. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 74, p. 327-340, 1981.
- DADOUNE JP.. Expression of mammalian spermatozoal nucleo-proteins. *Microsc Res Tech* 61:56–75, 2003.
- ELLINGTON J.E., EVENSON D.P., FLEMING J.E., BRISBOIS R.S., HISS G.A., BRODER S.J., WRIGHT R.W. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil. Steril.* 69, 643-649, 1998.
- EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v. 210, p. 1131-1133, 1980.
- EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, LK. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Science*, v. 22, n.2-3, p.169- 89, 2002.
- GATEWOOD JM, COOK GR, BALHORN R, SCHMID CW, BRADBURY EM.. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem* 265:20662–20666, 1990.

- GILBERT, A. B. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E. S. Z. Reprodução animal. São Paulo: Manole, 1982. p.488-515.
- GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical área of morpholocally normal and abnormal Bull spermatozoa heads. *Acta Veterinaria Scandinavia*, Vanlose, v.7, p. 1-20, 1966.
- GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical even of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. *Acta Vet. Scand.*, v.7, p.1-20, 1966.
- GREEN GR, BALHORN R, POCCIA DL, HECHT NB.. Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev* 37:255–263, 1994.
- GUSSE M, CHEVAILLIER P.. Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J Cell Biol* 87:280–284, 1980.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reproduction in farm animals. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. 512 p.
- JANUSKAUSKAS A, JOHANNISSON A, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. *Theriogenology*, v.55, p.947-981, 2001.
- JANUSKAUSKAS A, JOHANNISSON A, Rodriguez-Martinez H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability chromatin structure and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.
- JOHNSON G.D., LALANCETTE C., LINNEMANN A.K., LEDUC F., BOISSONNEAULT G., KRAWETZ S.A.. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*, v.141, p.21-36, 2011.
- KISTLER WS, HENRIKSEN K, MALI P, PARVINEN M.. Sequential expression of nucleoproteins during rat spermiogenesis. *Exp Cell Res* 225:374–381, 1996.
- LADIR, E.C. et al., Eficiência reprodutiva de galos reprodutores de corte submetidos à dieta com diferentes níveis de energia metabolizável e proteína bruta. 2012.
- LEWIN, L. M. et al. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 124, p. 133-137, 1999.
- LOIR, M.; LINNEAU, M. Partial characterization of ram spermatid basic nuclear proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 80, p. 974-982, 1978.
- LOVE CC. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.39-45, 2005.

- LUCCA, W. et al . Efeito de dois níveis de proteína para machos reprodutores de corte com e sem retirada da crista. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 1, fev. 2009 .
- MARUSHIGE Y, MARUSHIGE K.. Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. *J Biol Chem* 250:39–45, 1975.
- McKAY DJ, RENAUD BS, DIXON GH.. Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur J Biochem* 156:5–8, 1986.
- MEISTRICH ML.. Histones and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. In: Hnilica LS, Stein GS, Stein JL, editors. *Histones and other basic nuclear proteins*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp.165–182, 1989.
- MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, v.74, p.387-392, 1982.
- MEYER G.B., PROPS C.F., LEIGHTON A.T., VAN KREY H.P. and POTTER L.M. : Influence of dietary protein during the prebreeder period on subsequent reproductive performance of Large White turkeys. 2. Growth, feed consumption and male sex-limited reproductive traits. *Poultry Science*, v 59, 358-362, 1980.
- MURAKAMI, A.E.; GARCIA, E. R. M. Importância da reprodução das aves no sistema produtivo brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia: CBRA, 2005.
- NAKANO, M. et al. Conformation of the fowl protamine, galline, and its binding properties to DNA. *Journal of Biochemistry*, v. 105, p. 133-137, 1989.
- NANASSY L, CARRELL DT.. Paternal effects on early embryogenesis. *J Exp Clin Assist Reprod* 5:2, 2008.
- NUNES F. Brasil: entre los líderes de carne de pavo. *Rev Ind Avíc*, v.53, n.10,31-34, 2006.
- PITTOGGI C, RENZI L, ZACCAGNINI G, CIMINI D, DEGRASSI F, GIORDANO R, MAGNANO AR, LORENZINI R, LAVIA P, SPADAFORA C. 1999. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* 112 (Part 20):3537–3548, 1999.
- PRODUÇÃO de peru ganhará espaço na avicultura brasileira. 21 mar. 2012. Disponível em: <http://www.aviculturainustrial.com.br/noticia/producao-de-peru-ganhara-espaco-na-avicultura-brasileira/20120321174236_R_600>. Acesso em 21 jan. 2012.
- ROCHA JÚNIOR, J.M.; BAIÃO, N.C. Características físicas do sêmen de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, p.683-685, 2001

- ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T.T.; AMORIM, D. A. Z. The use of acridine orange and toluidine blue in the evaluation of male fertility. *Bioscience Journal*, v. 18, n. 1, p. 65-77, 2002.
- RODENAS, C.E.O.; MURGAS, L.D.S.; MACIEL, M.P. et al. Características seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. *Cienc. Agrotec.*, v.29, p.160-167, 2005.
- RODRIGUES, A. C. N. et al. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v.61, n.6, p.1302-1307, 2009.
- RUSSEL, L. D. et al. Evaluation of the testis. Clearwater: Cache River, 1990. 286 p.
- SEXTON T.J. : Effect of dietary protein and season on fertility of turkey semen stored 18 hours at 50 C. *Poultry Science*, v.65,604-604, 1986.
- SHAMAN, J.A. et al. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch. Androl.*, v.53, p.135-140, 2007.
- SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada de duas idades. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 543-553, 2006a.
- SOARES, J.M., BELETTI, M. E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozóides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* .São Paulo, v. 43, n. 4, p. 554-560, 2006.
- SOBIOLOGIA. *Espermatozóides*. Acesso em: 29/10/2011 <<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/embriologia/reproducao4.php>>
- SOLEY, J. T. Differentiation of the acrosomal complex in ostrich (*Struthio camelus*) spermatids. *Journal of Morphology*, v. 227, p. 101-111, 1996.
- SOLEY, J. T. Ultrastructure of ostrich (*Struthio camelus*) spermatozoa: I. Transmission electron microscopy. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 2, p. 119-130, 1993.
- SOTIROV L., DIMITROV S., JELIAZKOV E.. Semen lysozyme levels and semen quality in Turkeys (*Meleagris gallopavo*) fed with various dietary protein levels, *Revue Méd. Vét.*, v 153, n 12, 815-818, 2002.
- TANPHAICHITR N, SOBHON P, TALUPPETH N, CHALERMISARACHAI P.. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 117:347–356, 1978.

- TARDIN, A.C. Novos conceitos de alimentação de matrizes pesadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.27, p.36-70, 1990.
- TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J., Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, Oxford, v.13, n.7, p. 1864-1871, 1998.
- UBA – União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2005-2006, 2006. Disponível em <http://www.uba.org.br/ubanews_files/rel_uba_2005_06.pdf>. Acesso em 04 out. 2010.
- ZALENSKAYA IA, BRADBURY EM, ZALENSKY AO.. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 279:213–218, 2000.